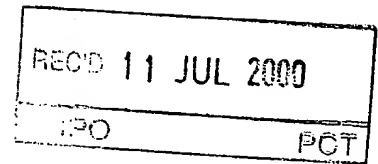


ES00/197

ESU



OFICINA ESPAÑOLA

de

PATENTES y MARCAS

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE ADICIONAL número 9901235, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 4 de Junio de 1999.

Madrid, 29 de junio de 2000

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.
P.D.

M. MADRUGA

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(1) <input checked="" type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA		(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD PATENTE NUMERO SOLICITUD 9800814 FECHA SOLICITUD 17 ABR 98 MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD		NUMERO DE SOLICITUD P 98001235 FECHA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.	
(3) LUGAR DE PRESENTACION MADRID		CODIGO ES		FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.	
(4) SOLICITANTES(S) UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID		APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA EXENTO DE PAGO DE TASAS (art. 53 de la Ley Orgánica 11/1983 de Reforma Universitaria)		NOMBRE Q28180141	

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE		DOMICILIO RECTORADO-AVENIDA DE SENECA, 2		OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS	
LOCALIDAD MADRID		Dpto. SECRETARIA GENERAL		TELEFONO 91 394 63 74	
PROVINCIA MADRID		REPROGRAFIA		CODIGO POSTAL 28040	
PAIS RESIDENCIA ES		Panamá, 1 - Madrid 28071		CODIGO PAIS ES	
NACIONALIDAD ES				CODIGO NACION ES	

(6) INVENTORES		(7) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO EL INVENTOR O UNICO INVENTOR		(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO <input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION	
APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD	
PEREZ GOMARIZ		ROSA		ES	
LECETA MARTINEZ		JAVIER		ES	

(9) TITULO DE LA INVENCION
Composición y método para el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos.

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
--	---

(11) EXPOSICIONES OFICIALES	
LUGAR	FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
--	---

(14) REPRESENTANTE	APELLIDOS	NOMBRE	CODIGO
DOMICILIO	LOCALIDAD	PROVINCIA	COD. POSTAL

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN		FIRMA DEL FUNCIONARIO
<input type="checkbox"/> DESCRIPCION. Nº DE PAGINAS..... <input type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. Nº DE PAGINAS. <input type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº DE PAGINAS..... <input type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input type="checkbox"/> OTROS	

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE
Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa dence-Vicerrector de Investigación sión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.	

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

UNE A-4 MOD. 3101i



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NUMERO DE SOLICITUD

P 9 0 1 2 3 5

FECHA DE PRESENTACION

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

☒ PATENTE DE INVENCION☐ MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES	APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRE	DNI
(6) INVENTORES	APELLIDOS	NOMBRE	NAC.
DELGADO MORA MARTINEZ MORA		MARIO CARMEN	ES ES
(11) EXPOSICIONES OFICIALES			
LUGAR:		FECHA:	
(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	CODIGO	NUMERO	FECHA



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD

P 9 0 1 2 3 5

FECHA DE PRESENTACION

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Composición y método para el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos. Se describe la composición y uso de agentes terapéuticos que inhiben la producción de factor de necrosis tumoral e interleuquina 6, y que inducen elevados niveles de interleuquina 4 para el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes, respectivamente, en mamíferos. La composición incluye sustancias tales como péptido intestinal vasoactivo, péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria, sus respectivos fragmentos y derivados.

GRAFICO



(31) NUMERO

9100834

(32) FECHA

17. abril 99

(33) PAIS

ES

A1

(12)

PATENTE DE INVENCION

(21)

NUMERO DE SOLICITUD

(22)

FECHA DE PRESENTACION

NACIONALIDAD

ES

(71) SOLICITANTE (S)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DOMICILIO RECTORADO. AVENIDA DE SENECA, 2

MADRID

28040 MADRID

(72) INVENTOR (ES) ROSA PEREZ GOMARIZ/ JAVIER LECETA MARTINEZ
MARIO DELGADO MORA/ CARMEN MARTINEZ MORA

(73) TITULAR (ES)

(11) N.º DE PUBLICACION

(45) FECHA DE PUBLICACION

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TITULO

COMPOSICION Y METODO PARA EL TRATAMIENTO DEL
"SHOCK" ENDOTÓXICO Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y
AUTOINMUNES EN MAMÍFEROS

(57) RESUMEN (APORTACIÓN VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

Composición y método para el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos. Se describe la composición y uso de agentes terapéuticos que inhiben la producción de factor de necrosis tumoral e interleuquina 6, y que inducen elevados niveles de interleuquina 4 para el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes, respectivamente, en mamíferos. La composición incluye sustancias tales como péptido intestinal vasoactivo, péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria, sus respectivos fragmentos y derivados.

TÍTULO

Composición y método para el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos.

5

ESTADO DE LA TECNICA

El shock endotóxico es todavía la mayor causa de mortalidad hospitalaria. Las estrategias para combatir los efectos del shock endotóxico se centran en contrarrestar los agentes bacterianos responsables del cuadro, en restaurar los parámetros hemodinámicos, prevenir la activación celular y modificar la acción de los mecanismos de defensa (Boyd O; Current Opinion in Anaesthesiology 1996, 9:98).

Hoy en día se acepta que la respuesta inflamatoria frente a los productos bacterianos contribuye directamente al desarrollo del shock endotóxico (Parillo JE; New England Journal of Medicine 1993, 328:1471). Los productos tóxicos bacterianos y los liberados durante el daño tisular activan los mecanismos de defensa, implicando a células como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales, y a mediadores como citoquinas, factor de activación de las plaquetas, metabolitos del ácido araquidónico y óxido nítrico, causando cambios hemodinámicos y orgánicos lesivos para el huésped (Moldawer LL; Critical Care Medicine 1994, 22:3). Muchas citoquinas han sido propuestas como marcadores de la gravedad en el desarrollo del choque séptico. Los niveles circulantes de $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 e IL-8 se han correlacionado con la probabilidad de superar un episodio séptico. $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 administradas a humanos o a animales experimentales reproducen muchas de las manifestaciones hemodinámicas del choque séptico (Tracey KJ y col.; Science 1986, 234:470) y se ha ensayado su inhibición mediante inyección de receptores antagonistas y anticuerpos monoclonales neutralizantes con resultados diversos (Fisher CJ y col.; Critical Care Medicine 1994, 22:12). Entre los marcadores inmunológicos los niveles circulantes de IL-6 son los

mejores indicadores de la gravedad de la sepsis y de las posibilidades de superación del episodio (Liaw YS y col.; Journal of the Formosan Medical Association 1997, 96:685).

A pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos y de los progresos técnicos y farmacológicos hay todavía pocos resultados en una mejora de los datos de mortalidad que se traducen en una cifra de unos 200.000 decesos al año en Estados Unidos y Europa (Vicent J-L y Chamblou R; Current Opinion in Anaesthesiology 1996, 9:146).

Los procesos inflamatorios son un proceso vital para la supervivencia de todos los organismos complejos. De forma natural la inflamación es un proceso de defensa del organismo frente a un agente extraño. La acumulación y activación de leucocitos en los lugares donde se produce la agresión es un acontecimiento central en todo proceso inflamatorio (Schaal TJ y Bacon KB; Current Opinion in Immunology 1994, 6:865). Una respuesta inflamatoria insuficiente puede comprometer la supervivencia del organismo, pero una respuesta excesiva, que puede deberse a fallos en los mecanismos de desactivación del proceso por distintas causas, puede terminar desencadenando una enfermedad inflamatoria o autoinmune (Sacca R y col.; Current Opinion in Immunology 1997, 9:851). Estas enfermedades son una causa importante de morbilidad y mortalidad en los mamíferos por los daños tisulares asociados a dichos procesos.

Los macrófagos juegan un papel central en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias. La ejecución de estas actividades está mediada por toda una serie de procesos complejos en los que intervienen, entre otros, muchos productos de origen macrofágico. Como respuesta a los antígenos, y según su origen, los macrófagos secretan citoquinas proinflamatorias y agentes oxidantes, tales como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β , IL-12 y óxido nítrico (Laskin DL y col.; Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1995, 35:655). $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 son, entre otros, dos factores que contribuyen a los cambios fisiopatológicos asociados con varios estados de inflamación crónica o aguda. Los macrófagos, además, participan en el inicio, mantenimiento y control de las respuestas inmunes, actuando como potentes presentadores de antígenos,

proporcionando a los linfocitos T una doble señal de activación: el complejo antígeno-moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y una señal coestimuladora mediada por moléculas de la familia B7 (Lenschow DJ y col.; Annual Review of Immunology 1996, 14:233). Las moléculas B7 comprenden dos isoformas, B7.1 y B7.2, cada una de ellas implicada en la estimulación de dos tipos de células T colaboradoras (Th) distintas, Th1 y Th2 respectivamente, y cada una de ellas produce un conjunto de citoquinas distintas (Kuchroo VK y col.; Cell 1995, 80:707).

La activación de las células Th1 implica la producción, entre otros factores, de IFN γ e IL-12, está asociada a la producción de anticuerpos de isotipo IgG2a y se manifiesta como una reacción de tipo inflamatorio retardado. La activación de células Th2 implica la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 entre otros factores, está asociado a la secreción de anticuerpos de isotipo IgG1, inhibe la respuesta inflamatoria retardada y se manifiesta como una respuesta humoral (Constant SL y Bottomly K; Annual Review of Immunology 1997, 15:297). Los factores que determinan la diferenciación de uno u otro tipo de respuesta son, principalmente, las características de las células presentadoras de antígenos y las citoquinas presentes en el microambiente en el que se desarrolla la respuesta: IL-12 determina la diferenciación de células Th1 mientras que IL-4 lo hace de Th2. Cuando ambas están presentes predomina el efecto de IL-4 (O'Garra AO; Immunity 1998, 8:275). Numerosos casos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes se deben a la activación de un tipo de células Th inadecuado.

El Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) es un péptido básico de 28 aminoácidos cuya secuencia es (Mutt V y Said SI; European Biochemistry 1974, 42:581):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

Se aisló en primer lugar a partir de intestino delgado porcino y posteriormente se identificó en el cerebro y en terminaciones nerviosas del sistema periférico,

estableciéndose su naturaleza como neuropéptido con propiedades neuromoduladoras (Fahrenkrug J; Pharmacology and Toxicology 1993, 72:354). Su nombre se debe a sus propiedades vasodilatadoras periféricas. También se ha identificado VIP en células cebadas de rata y en granulomas (Cutz E. y col.; Nature 1978, 275:661). Estudios inmuoquímicos realizados en secciones histológicas de timo, bazo y ganglios linfáticos de rata han identificado VIP inmunoreactivo en linfocitos de estos órganos (Gomariz RP y col; Annals of the New York Academy of Sciences 1992, 650:13; Leceta y col.; Advances in Neuroimmunology 1996, 6:29).

- 10 El VIP ejerce sus efectos biológicos a través de receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de siete dominios hidrofóbicos acoplados a proteínas G, las cuales transducen la información hasta las moléculas efectoras finales (Laburthe M y Couvineau A; Annals of the New York Academy of Sciences 1988, 527:296). Los receptores para VIP han sido caracterizados en numerosos tejidos como hígado y tejido
- 15 adiposo entre otros y que corresponden a dos tipos, los llamados VIP1 -R (Ishihara T y col.; Neuron 1992, 8:811) y VIP2-R (Lutz E. y col.; FEBS Letters 1993, 334:3). En el sistema inmune se han caracterizado receptores específicos para VIP en una variedad de células inmunes que incluyen linfocitos periféricos humanos, monocitos humanos, linfocitos de rata y de ratón, macrófagos alveolares de rata y macrófagos peritoneales de
- 20 rata y ratón (Gomariz RP y col.; Biochemical and Biophysical Research Communications 1994, 203:1599; Delgado M y col.; Regulatory Peptides 1996, 62:161). El VIP modula una gran variedad de funciones inmunes como son la función fagocítica, en cada una de las etapas del proceso, la respuesta proliferativa, la producción de inmunoglobulinas, la actividad NK y la producción de citoquinas (De La Fuente M y
- 25 col.; Advances in Neuroimmunology 1996, 6:75).

El péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) es un miembro de la familia de péptidos de la secretina/VIP/glucagon del que se conocen dos formas

moleculares PACAP-38 y PACAP-27, cuyas secuencias son respectivamente (Ogi K y col.; Biochemical and Biophysical Research communication 1993, 196:1511):

PACAP-38

- 5 His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH₂

PACAP-27

- 10 His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂

Ambos péptidos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico.

- 15 También hay células productoras de PACAP en pulmón, células B pancreáticas e intestino

(Arimura A; Regulatory Peptides 1992, 37:287). En el sistema inmune se ha descrito una gran abundancia de células positivas para PACAP en órganos linfoides centrales y periféricos (Gaytan F y col.; Cell and Tissue Research 1994, 276:233). Para el PACAP se han descrito tres tipos de receptores (Shivers BD y col.; Endocrinology 1991, 128:3055;

- 20 Inagaki N y col.; Proceeding of the National Academy of Sciences USA 1994, 91:2679) : el receptor de PACAP tipo I (PACAP-R-I) con igual afinidad para el PACAP-38 y el PACAP-27, pero que posee una afinidad de 300 a 1000 veces menor por el VIP ; el receptor de PACAP tipo II (PACAP-R-II) que reconoce con la misma afinidad al VIP, PACAP-38 y PACAP-27 por lo que se le denomina receptor común de VIP-PACAP y corresponde al receptor de VIP VIP1-R, y el receptor de PACAP tipo III (PACAP-R-III) que corresponde al receptor de VIP VIP2-R. Hasta el momento, son escasos los estudios sobre las acciones biológicas del PACAP en el sistema inmune. Los efectos del PACAP
- 25

son en muchos casos similares a los del VIP modulando la función fagocítica y las respuestas proliferativas.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5

El objeto de esta invención es desarrollar preparados de VIP, PACAP y análogos como agentes terapéuticos en el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

10

El tratamiento consiste en la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) o de IL-6 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o bien la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente que aumente la producción de IL-4, inhibiendo la activación de células Th1 y estimulando la activación de células Th2.

15

Se sabe que la mayoría de los efectos del shock endotóxico están mediados por la activación del sistema inmune y los mecanismos inflamatorios del huésped como respuesta a los productos bacterianos. Los macrófagos juegan un papel muy relevante en este proceso pues tras su activación producen factores como óxido nítrico, prostaglandinas y citoquinas responsables de síntomas tales coma fiebre, hipotension, microcoagulacion diseminada, fallo organico multiple y eventualmente la muerte. En este sentido se han descrito elevados niveles circulantes de TNF, IL-1 e IL-6 asociados a endotoxemia. En modelos animales estos sintomas se reproducen tanto por la administration de endotoxinas bacterianas (LPS) como por la inyección de TNF e IL-1. Otros estudios han puesto de manifiesto el valor diagnostico en cuanto a probabilidad de supervivencia que representan los niveles circulantes de IL-6 (Stoiser B y col.; European Journal of Clinical Investigation 1998, 28:672).

20

25

El factor de necrosis tumoral (TNF) es producido por varios tipos celulares que incluyen monocitos y macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos, células cebadas, células tumorales y fibroblastos. Es un importante factor regulador de otras citocinas pro-inflamatorias, como son IL-1 β , IL-6 e IL-8. El TNF α induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, activa a los leucocitos para que destruyan los microorganismos, actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de proteínas séricas que contribuyen a la respuesta de fase aguda y activa el sistema de coagulación. Su sobreproducción conduce a enfermedades inmunopatológicas, autoinmunidad e inflamación.

La IL-6 es una citoquina multifuncional producida tanto por linfocitos como por células no linfoides. Regula varios aspectos de la respuesta inmune, como la producción de proteínas que median la fase aguda y la hematopoyesis. Además actúa como mediador en la respuesta inflamatoria. Su producción esta regulada por varios factores, que incluyen TNF α , IL-1 y endotoxina bacteriana (LPS).

La IL-4 es una citoquina que inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B activados y aumenta la expresión de moléculas MHC de tipo II en linfocitos B. Se ha puesto de relieve su posible utilización clínica en tratamientos antiinflamatorios y enfermedades autoinmunes.

Se han ensayado estrategias de neutralization de citoquinas proinflamatorias en el tratamiento del shock endotoxico pero los resultados no muestran que se produzca una mayor supervivencia a largo plazo. Un tratamiento que inhiba la production de TNF α e IL-6 representaría una considerable mejora en la evolución del shock endotóxico y en las probabilidades de supervivencia. La administration de VIP y PACAP en modelos animales consigue estos efectos y nuestro invento consiste en la utilización de un

tratamiento con estos neuropéptidos para aumentar la supervivencia en cuadros de shock endotóxico y revertir estados inflamatorios patológicos y enfermedades autoinmunes.

El VIP y el PACAP tienen efectos antiinflamatorios e inhiben la producción de IL-6 y TNF α en modelos animales de inducción de shock endotóxico. Al jugar estas citoquinas un papel importante en el desarrollo de dicho síndrome, VIP y PACAP pueden utilizarse para regular su producción. Además VIP y PACAP modulan la capacidad de las células presentadoras de antígenos para actuar induciendo la activación proliferación y diferenciación de linfocitos con un patrón de secreción de citoquinas típico de las células Th2 y condicionan las respuestas inmunes "in vivo" favoreciendo el desarrollo de respuestas de tipo humoral.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa la producción de TNF α por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) estimuladas con 10ng/ml de LPS en presencia o ausencia de 10^{-8} M de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 2 representa la producción de TNF α por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ng/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos, 10^{-8} M de VIP o PACAP.

La Figura 3 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) estimuladas con 10ng/ml de LPS en presencia o ausencia de 10^{-8} M de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 4 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ngr/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos, 10^{-8} M de VIP o PACAP.

- 5 La Figura 5 presenta el análisis por Northern blot para la presencia de mRNA de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 en macrófagos estimulados con LPS en presencia o ausencia de VIP o PACAP (18S representa el correspondiente rRNA como control de la cantidad total de RNA cargada).

- 10 La Figura 6 representa la supervivencia de ratones inyectados con 400 μ gr. de LPS y simultáneamente o a los 30 minutos, 1 o 4 horas con 5nmol. de VIP o PACAP.
A. Control; B: VIP a 0h.; C: VIP a 0,5 h; D: VIP a 1 h.; E: VIP a 4 h.

- 15 La Figura 7 representa el número de células secretoras de IL-4 en bazo y peritoneo detectadas mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción en placa conjugado con enzima (ELISPOT) en ratones inmunizados en las condiciones especificadas en el Ejemplo 7 y que simultáneamente a la segunda inyección del antígeno recibieron 5nmol de VIP o PACAP o una inyección de solución salina.

- 20 La Figura 8 representa la cantidad de inmunoglobulinas anti-hemocianina de caracol (anti-KLH) de los isotipos IgG2a e IgG1 detectables en suero mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción conjugado con enzima (ELISA) en ratones inmunizados en las condiciones especificadas en el Ejemplo 8 y tomadas las muestras de suero dos semanas después de la última inyección.

25

La Figura 9 representa el número de células productoras de IL-4 detectadas mediante la técnica de ELISPOT en ratones que fueron inmunizados en las condiciones especificadas en los Ejemplos 7 y 8 y que en la segunda inyección recibieron o no 5nmol de VIP junto con 100 μ gr de IgG, anti-B7.1 o anti-B7.2.

MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

Los ejemplos que siguen son solo para ilustrar los resultados conseguidos y no limitan la
5 utilización del invento que se detallan en las reivindicaciones especificadas.

EJEMPLO 1

VIP y PACAP inhiben la producción de $\text{TNF}\alpha$ en macrófagos estimulados con LPS

10

En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de $\text{TNF}\alpha$ en
macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición
alcanza valores cercanos al 60% y se produce con dosis de estimulación entre 1-10
ngr./ml de LPS. La IC_{50} es de unos 80 pM, tanto para VIP como para PACAP y su
15 efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 1). El efecto inhibitor es el
mismo si ambos neuropéptidos se añaden hasta 1 hora después de estimular los
macrófagos con LPS, aunque disminuye progresivamente hasta desaparecer si se añaden
después de 4 horas (ver Figura 2).

20 EJEMPLO 2

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de $\text{TNF}\alpha$ después de la inyección de LPS

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de $\text{TNF}\alpha$ 2 horas
25 después de la inyección de 25 $\mu\text{gr.}$ de LPS se aproximaron a los 4 ngr./ml. La
administración simultánea de 5nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60%.

EJEMPLO 3

30 VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos estimulados con LPS

En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 90% y se produce con dosis de estimulación de 10 μ gr./ml de LPS. La IC_{50} es de 8.6 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 3). El efecto inhibitor también se observa si los

neuropéptidos se añaden después de la estimulación con LPS, aunque el grado de inhibición es progresivamente menor (ver Figura 4).

EJEMPLO 4

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de IL-6 después de la inyección de LPS

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de IL-6 dos horas después de la inyección de 25 μ gr. de LPS se aproximaron a 1.5 ngr./ml. La administración simultánea de 5nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60% y un 75% respectivamente.

EJEMPLO 5

VIP Y PACAP regulan la producción de $TNF\alpha$ e IL-6 a nivel transcriptional

Se sometieron macrófagos de ratón a las condiciones experimentales de los ejemplos 1 y 3 y se aisló su mRNA, que después se analizó mediante Northern blot para detectar mRNA de $TNF\alpha$ e IL-6. La Figura 5 muestra la ausencia de transcritos para $TNF\alpha$ o IL-6 cuando los macrófagos activados con LPS son expuestos además a VIP o PACAP.

EJEMPLO 6

VIP y PACAP protegen de los efectos letales de LPS

- 5 Se realizó un experimento en el que se estudió la supervivencia a lo largo de un periodo de 4 días en ratones después de inyectarles 400 μ gr. de LPS. Los resultados se reflejan en la Figura 6. La mortalidad en estas circunstancias fue del 100% a las 36 horas. Con la administración simultánea de 5 nmol. de VIP o PACAP se consiguió una supervivencia del 60% al final del experimento. La administración de los neuropeptidos hasta 1 hora
10 después de la inyección de LPS todavía registró tasas de supervivencia cercanas al 50%.

EJEMPLO 7

VIP y PACAP aumentan la proporción de células secretoras de IL-4.

- 15 Grupos de ratones fueron inmunizados con 50 μ gr de KLH emulsionados en un adyuvante, repitiéndose la inyección con 100 μ gr de KLH dos semanas después e inyectando simultáneamente 5 nmol/ratón de VIP, PACAP o solución salina. Dos semanas después de la última inyección se realizaron suspensiones celulares de bazo y
20 peritoneo que fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de 50 μ gr/ml de KLH, tras lo cual se determinó el número de células productoras de IL-4 mediante la técnica de ELISPOT. En los ratones inyectados con VIP o PACAP el número de células productoras de IL-4 aumentó del orden de 20 veces sobre los que no fueron tratados con estos neuropeptidos (ver Figura 7).

25

EJEMPLO 8

VIP y PACAP inducen la producción de anticuerpos del isotipo IgG1.

Grupos de ratones fueron inmunizados con 50 µgr de KLH emulsionados en un adyuvante, repitiéndose la inyección con 100 µgr de KLH dos semanas después e inyectando simultáneamente 5 nmol/ratón de VIP, PACAP o solución salina. Dos semanas después de la última inyección se determinaron los niveles de anti-KLH y su isotipo mediante ELISA específico para los isotipos IgG1 e IgG2a. En los ratones inyectados con VIP o PACAP los anticuerpos anti-KLH detectables en suero dos semanas después de la última inmunización son solamente del isotipo IgG1, mientras que en los que solamente recibieron solución salina fueron del isotipo IgG2a (ver Figura 8)

10

EJEMPLO 9

El aumento de la proporción de células productoras de IL-4 mediado por VIP y PACAP está relacionado con la expresión de B7.2 inducida por ambos neuropéptidos.

15

Grupos de ratones fueron inmunizados en las mismas condiciones de los Ejemplos 7 y 8, pero en el momento de la segunda inmunización con KLH los ratones que fueron inyectados simultáneamente con VIP o PACAP recibieron al mismo tiempo 100 µgr de anticuerpo anti-B7.1, anti-B7.2 o la misma cantidad de IgG como control. En los ratones que recibieron anticuerpos anti-B7.2 simultáneamente a la administración de los neuropéptidos el número de células productoras de IL-4 se redujo a la proporción alcanzada en los animales que no fueron inyectados con los neuropéptidos (ver Figura 9).

20

REIVINDICACIONES

- 1.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos caracterizado porque comprende la administración de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5
- 2.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.
10
- 3.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos, según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.
15
- 4.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos caracterizado porque comprende la administración de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción de la interleuquina 6 (IL-6) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
20
- 5.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos según la reivindicación 4, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.
- 25 6.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos, según la reivindicación 4, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

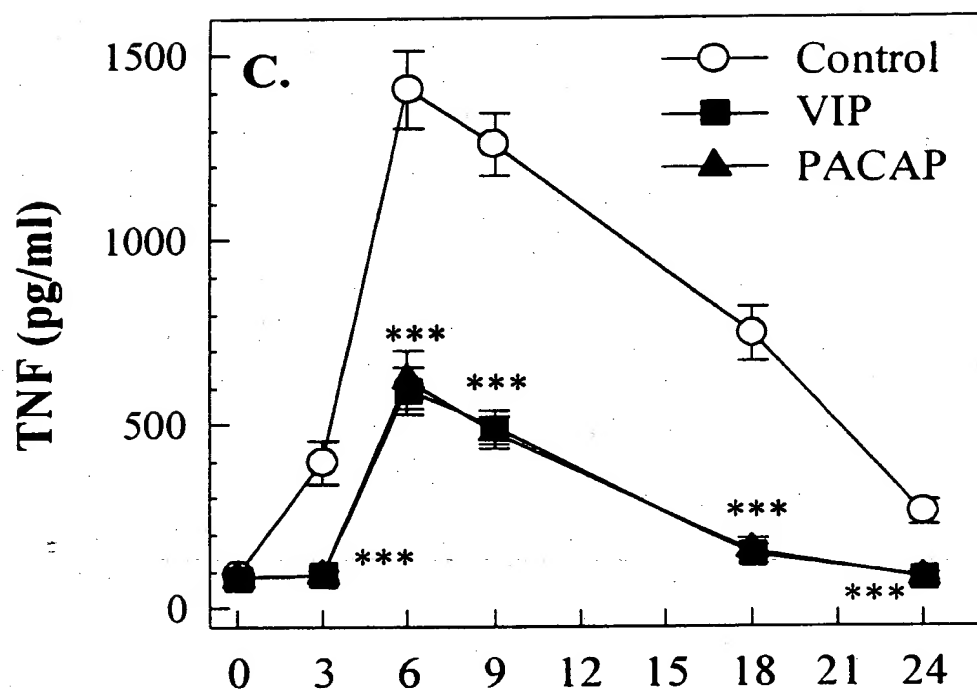
7.- Método para el tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes en mamíferos, caracterizadas por la activación de células Th1, que comprende la administración de una dosis efectiva de un agente, en un vehículo farmacéuticamente adecuado, que induzca elevados niveles de IL-4.

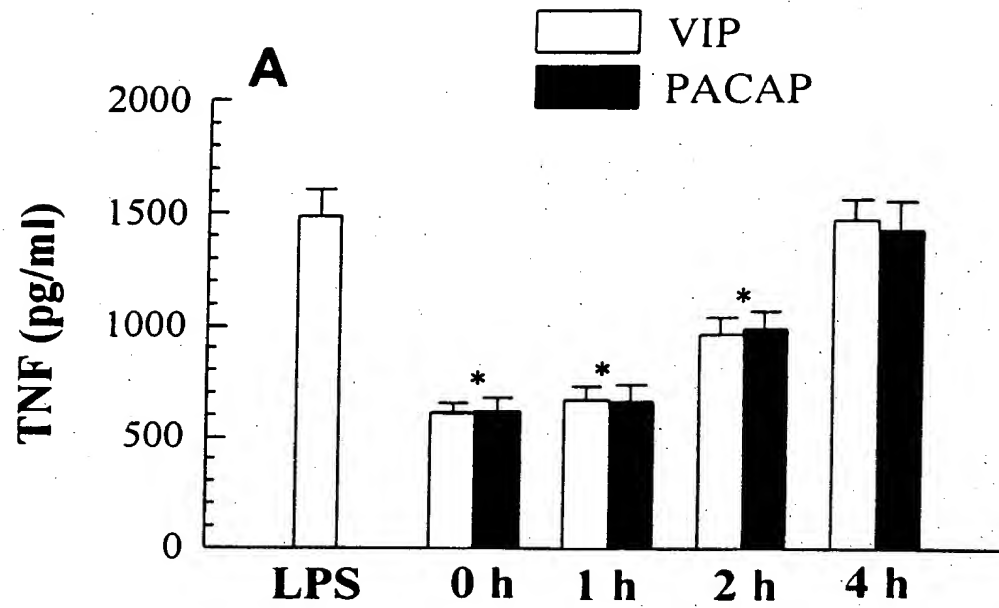
5

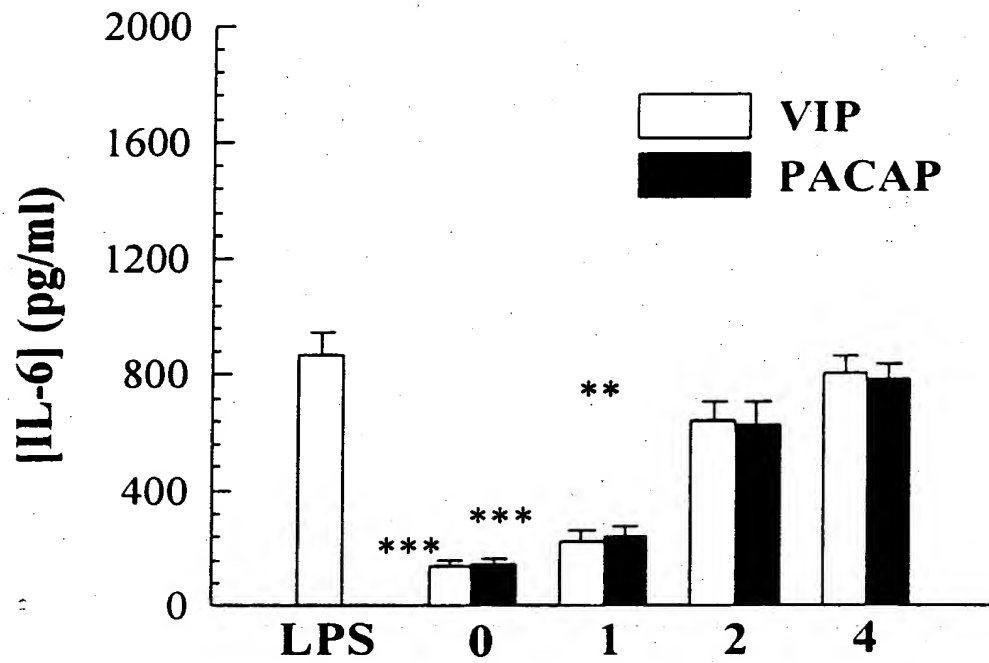
8.- Método para el tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes en mamíferos según la reivindicación 7, caracterizado porque el agente inductor es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

10

9.- Método para el tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes en mamíferos según la reivindicación 7, caracterizado porque el agente inductor es el péptido activador de la adenilato ciclasa hipotisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

**FIGURE 1**

**FIGURA 2**

**FIGURA 3**

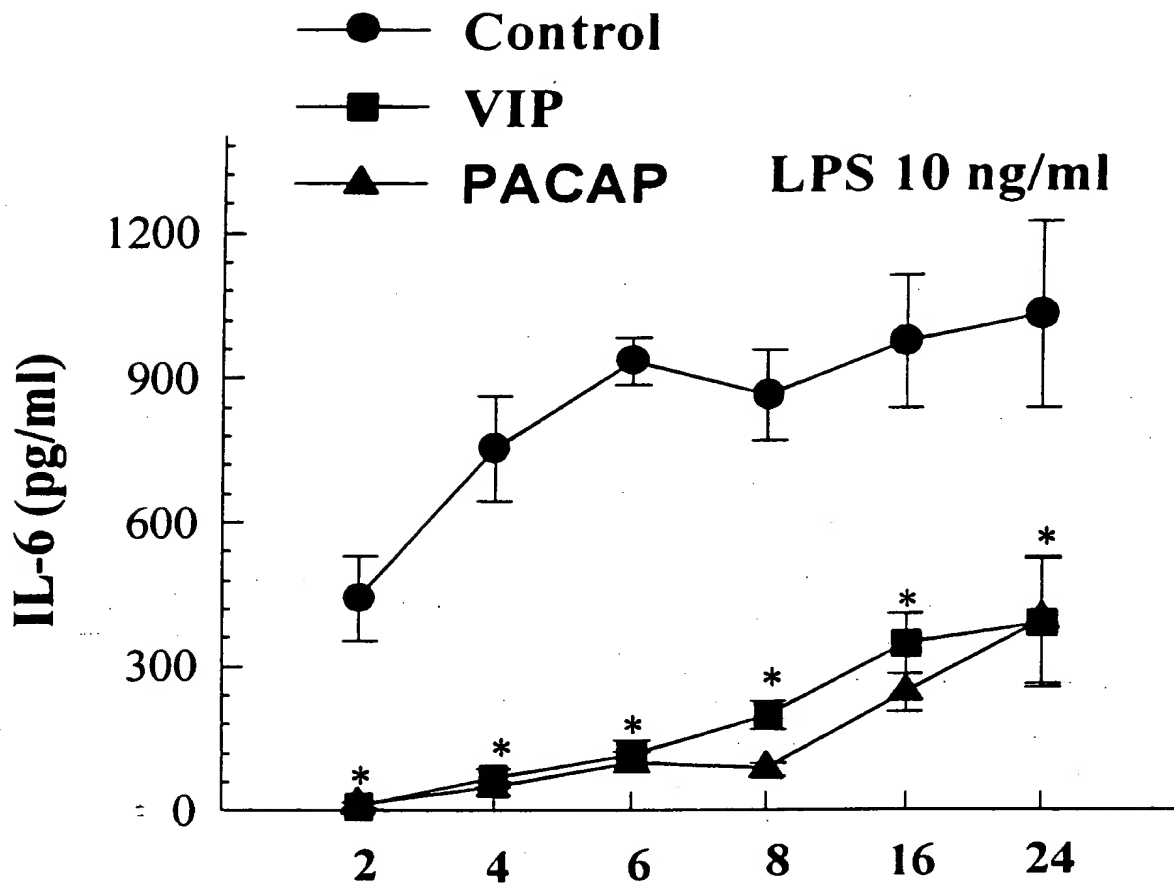


FIGURA 4

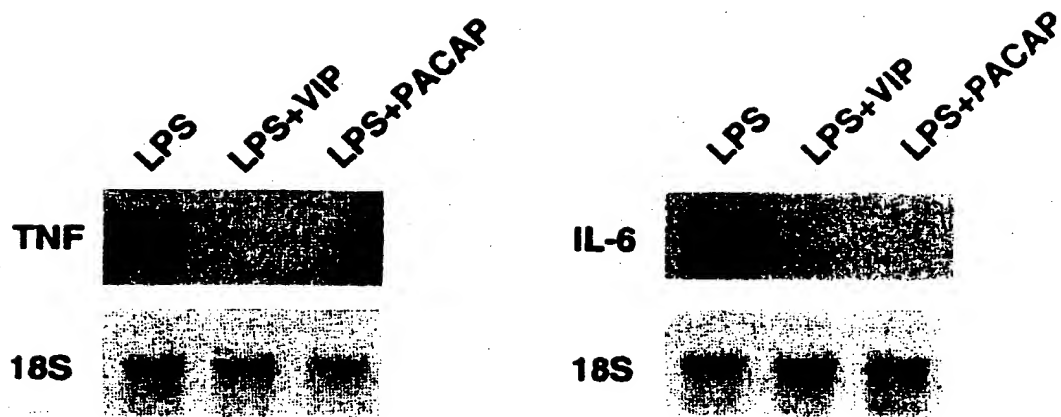


FIGURA 5

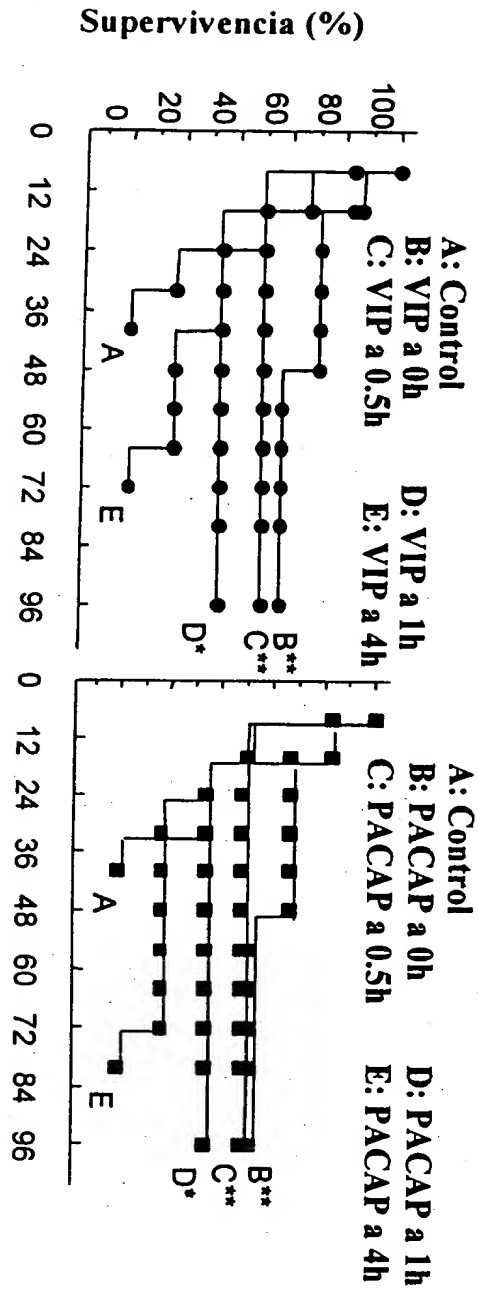


FIGURA 6

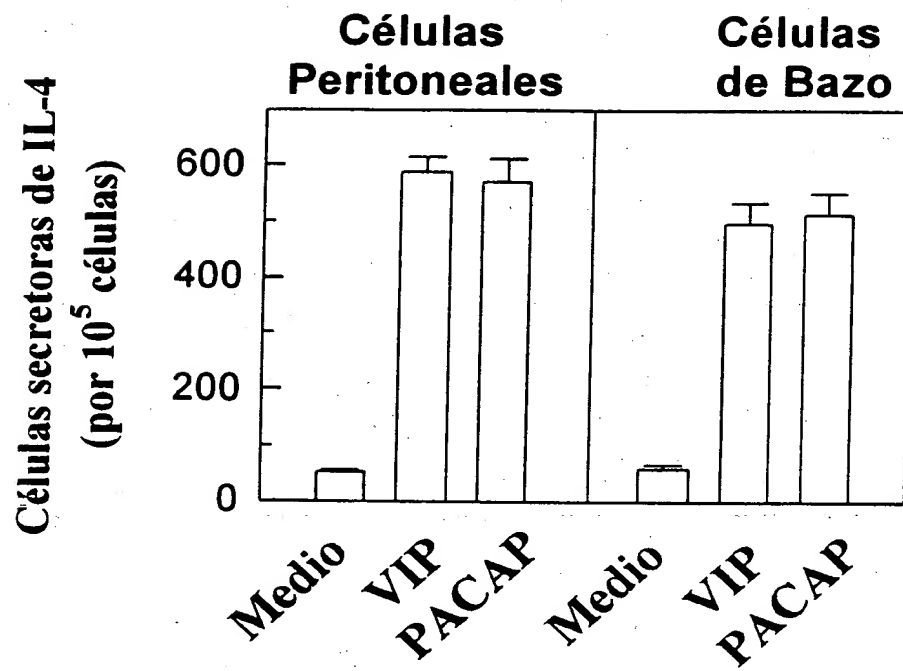


FIGURA 7

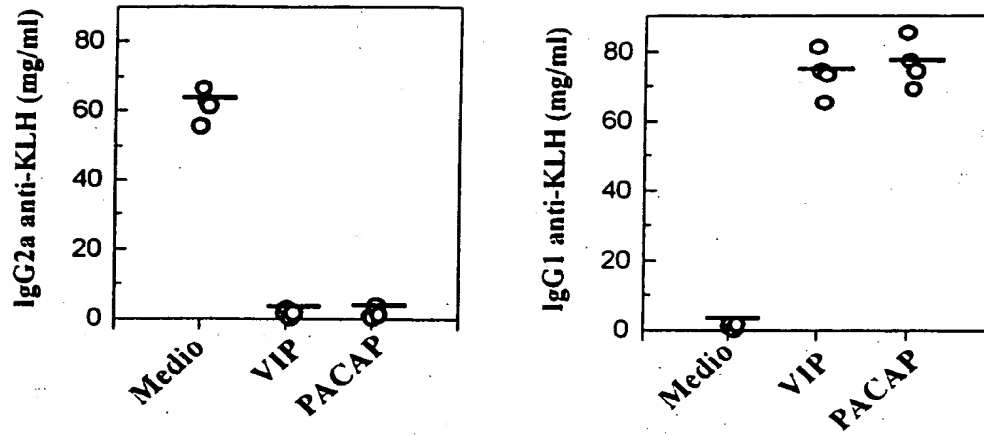


FIGURA 8

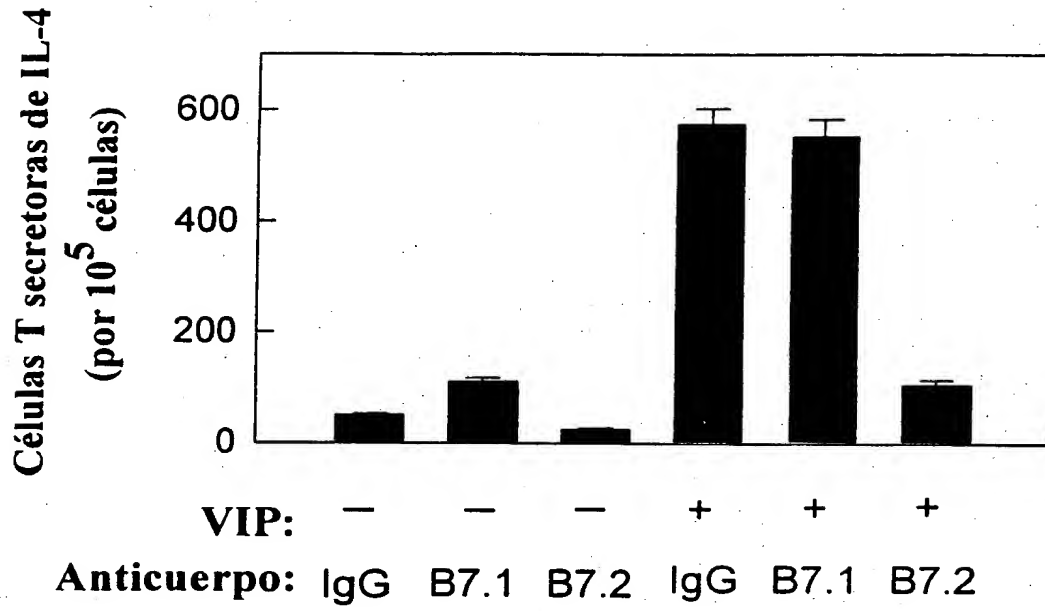


FIGURA 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)